

OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING BACTERIA AND METHOD OF DETECTION USING THE SAME

Publication number: JP2001231564

Publication date: 2001-08-28

Inventor: IIJIMA KAZUMARU; MOTOYAMA YASUAKI

Applicant: ASAHI BREWERIES LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68; C12N15/09; C12R1/01

- european:

Application number: JP20000041178 20000218

Priority number(s): JP20000041178 20000218

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2001231564

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a gene for detecting a bacterium belonging to the genus *Pediococcus* which grows in beer and muddies beer and a method for detecting the bacterium by the use of this gene. **SOLUTION:** This method is a method for detecting *Pediococcus damnosus* rapidly with high sensitivity by the use of a gene sequence in the spacer domain constituted between 16S rRNA gene and 23S rRNA gene specific to *Pediococcus damnosus* participating in beer muddiness.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-231564

(P2001-231564A)

(43) 公開日 平成13年8月28日 (2001.8.28)

(51) IntCl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 R 1:01)	4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:01)		C 1 2 R 1:01)	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2000-41178(P2000-41178)

(22) 出願日 平成12年2月18日 (2000.2.18)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 飯島 和丸

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社総合評価センター内

(72) 発明者 本山 靖朗

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出法

(57) 【要約】

【課題】 本発明はビール中で生育しビールを混濁させるペジオコッカス属の菌を検出するための遺伝子およびこれを用いた該菌の検出法を提供する。

【解決手段】 ビール混濁に関係するペジオコッカス・ダムノサスに特異的な16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子配列。その配列を用いて迅速に感度よくペジオコッカス・ダムノサスを検出する方法。

FP05-0056
000000-0000
05.5.24
SEARCH REPORT

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含むペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列。

【請求項2】 配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含むペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列。 10

【請求項3】 ペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16SrRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列が配列番号3の配列、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 請求項1または2に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドを核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) を 20 検出する方法。

【請求項5】 請求項1または2に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは請求項3に記載されたオリゴヌクレオチドと、ペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) を検出する方法。

【請求項6】 ペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16SrRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、配列番号4の配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである請求項5記載の方法。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ビール中で生育しビールを混濁させるペジオコッカス (*Pediococcus*) 属のペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) を検出するための遺伝子およびこれを用いた該菌の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ビールを混濁させる微生物（細菌）として、ペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) が知られている。この検出には、増殖培養、分離培養を経て菌を単離しなければならず、少なくとも7日は要する。その後、単離した菌を増殖させ、形態観察、グラム染色性、カタラーゼ試験、糖資化性など多くの性状試験を行うことにより同定を行っている。これらの多岐にわたる検査は煩雑であり、時間も費用もかかる。また、これら一般に行われている同定試験の他に、単離し 50

た菌からDNAを抽出し、それを膜状あるいは他の支持体上に固定し、標準菌のDNAをプローブとしてハイブリダイゼーション試験を行うことにより菌種を同定する方法がある。しかし、この方法も数日を必要とし、さらに十分な検出感度および選択性を得るのが難しい。

【0003】 そこで、最近ではペジオコッカス・ダムノサスに関する検出法として、ペジオコッカス・ダムノサスに特異的に反応する抗体を使用した方法 (Brauwelt: vol. 131, NO. 41 1797-1798, 1800-1802, 1991) がある。本法は蛍光抗体法でペジオコッカス・ダムノサスを染色後、レーザー照射光路に流して発色させて検出、計数するが、特異性の点で問題があった。

【0004】 また、以下に他の検出法を示す。菌体内で誘導体化した脂肪酸メチルエステルを熱分解質量分析法 (Pyrolysis mass spectrometry) を用いて質量スペクトルを得ることによりペジオコッカス・ダムノサスを同定する方法 (J. ASBC: vol. 55, NO. 2, 79-82 (1997)) がある。しかし、この方法は菌の単離が必須であり、迅速性、特異性の点で問題があった。

【0005】 5S rRNA遺伝子をターゲットとしたPCRおよび温度勾配ゲル電気泳動を用いてペジオコッカス・ダムノサスを同定する方法 (J. ASBC: vol. 52, NO. 3, 95-99 (1994)) がある。本法は5S rRNA遺伝子の細菌に保存性の高い領域をPCR反応で増幅し、さらに高GC含量のプライマーを用いて2回目のPCR反応を行う。得られたPCR産物を温度勾配ゲル電気泳動し、その泳動パターンによりペジオコッカス・ダムノサスを同定するというものである。しかし、この方法は菌の単離が必須であり、迅速性、特異性の点で問題があった。

【0006】 また、ペジオコッカス・ダムノサスの16S rRNA遺伝子および23S rRNA遺伝子の塩基配列を標的としてハイブリダイゼーション法により特異的にペジオコッカス・ダムノサスを検出する方法 (特表平8-503620) が開発されている。しかしながら、これらの技術に用いられている16S rRNA遺伝子および23S rRNA遺伝子は微生物の属を越えて類似している場合があり、検出したい特定の微生物以外の微生物も誤って検出してしまうことがあり、特異性の点で問題があった。

【0007】 一方、16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子は微生物種に特異的な塩基配列を有することが知られており、それを利用した微生物検出法としてPCT/JP99/04341、特願平10-286697があるが、ペジオコッカス・ダムノサスのスペーサー領域の遺伝子の塩基配列は明らかにされていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 そこで本発明では、ビール混濁に関係するペジオコッカス・ダムノサスに特異的な16S rRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子配列を提供し、その配列を

用いて迅速に感度よく検出できる方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】 (1) 第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含むペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(2) 第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含むペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(3) 第3の発明は、ペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列が配列番号3の配列の少なくとも一つを有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(4) 第4の発明は、(1) または (2) に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) を検出する方法である。

(5) 第5の発明は、(1) または (2) に記載された遺伝子配列より作製したオリゴヌクレオチドあるいは (3) に記載されたオリゴヌクレオチドとペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによってペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) を検出する方法である。

(6) 第6の発明はペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damnosus*) の16SRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、配列番号4の配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである (5) の方法である。

【0010】 遺伝子増幅に関する技術は既に公知であり、サイキ (R. Saiki) らが開発したポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction法、以下、PCR法と略す; Science 230, 1350 (1985)) を基に行うことが出来る。

【0011】 この方法は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応で、迅速・高感度で高い特異性を持ち、かつ簡便であることから、遺伝学的分野のみならず、近年は医療分野における病原菌の迅速判定や、食品分野における有害菌の迅速検出にも応用が試みられている。PCR法を行うことにより、検体中に僅かな量しか存在していなくても、2つのプライマーが挟む標的ヌクレオチド配列は何百倍にも増幅され、検出が可能にまで大量にそのコピーが産生される。また、PCR法を行うには、検体中に存

在する菌から核酸成分を遊離させる必要があるが、PCR法は標的配列が数分子以上存在すれば増幅反応が進むので、溶菌酵素や界面活性剤を用いた簡便な前処理をするだけで十分に試験に供することが出来る。そのため、従来の細菌検出法に比べ、利用価値が非常に高い。

【0012】

【発明の実施の形態】 これらのことを利用すべく、本発明では、ペジオコッカス・ダムノサスの16SrRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列を提供し、これらから選択したオリゴヌクレオチドもしくは16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列とペジオコッカス・ダムノサスの16S rRNA遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、PCR法の核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって検体中にペジオコッカス・ダムノサスが存在するか否かを迅速・高感度に判定する方法を開発した。

【0013】 検体は、ビール及びビール製造途中の半製品、または下水などの環境から採取されたサンプルでもよい。また、プライマーに用いるオリゴヌクレオチドは化学合成されたものでも天然のものでも、いずれの使用でも可能である。

【0014】 以下に、PCR法を用いて、ペジオコッカス・ダムノサスを検出する方法を示す。PCR法に用いた塩基配列は、配列番号3および4に示したものは一例であり、これに限定されたものではない。また、PCR法に用いるプライマー長は、前記配列番号3および4に記述したものは23塩基長であったが、これに限定したものではない。好ましくは、10~50塩基長のものを用いる。

【0015】 2つのプライマーが規定するペジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列および16S rRNA遺伝子のヌクレオチド配列上の標的配列の塩基長は、配列番号3および4を組み合わせた場合は1537塩基対および1728塩基対であり、これら2本のバンドがゲル電気泳動により検出された時はペジオコッカス・ダムノサスが存在していたと判定出来る。このプライマーの組み合わせは、ペジオコッカス・ダムノサスに特異的であるため、この菌種の検出に利用出来る。PCR法に用いるプライマーの塩基配列を変更させることで、増幅されるヌクレオチド配列の長さは変化する。

【0016】 PCR反応における温度条件は、2本鎖DNAを1本鎖にする熱変性反応で90~98℃、プライマーを鋳型DNAにハイブリダイズさせるアニーリング反応で37~65℃、DNAポリメラーゼを作用させる鎖長反応で50~75℃で行い、これを1サイクルとしたものを数十サイクル行わせることにより、標的配列を増幅させることができる。PCR反応後、反応物を電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドあるいはサイバークリーンで核酸染色

を行い、増幅されたヌクレオチド配列の塩基長が、上述の標的配列の塩基長と等しければ検体中に検出対象の菌が存在すると判定できる。増幅されたヌクレオチド配列の検出には、クロマトグラフィーも有効である。

【0017】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0018】実施例1

検体の調製

菌株はペジオコッカス・ダムノサス (*Pediococcus damn*

osus) (JCM5886) を使用した。また、本発明の配列番号3および4に示したペジオコッカス・ダムノサスプライマーの特異性を確かめるために、表1に示す他の細菌を使用した。これらを適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、新生化学実験講座2 核酸1 分離精製p20~21 (日本生化学会編、東京化学同人) に従って行い、DNA溶液を得た。

【0019】

【表1】

菌番号	菌種	菌株名	備考
1	<i>Pediococcus damnosus</i>	JCM5886	type strain
2	<i>Pediococcus acidilactici</i>	JCM5885	type strain
3	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	JCM5887	type strain
4	<i>Pediococcus halophilus</i>	JCM5888	type strain
5	<i>Pediococcus parvulus</i>	JCM5889	type strain
6	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM5890	type strain
7	<i>Leuconostoc oenos</i>	JCM6125	type strain
8	<i>Lactococcus lactis</i>	JCM5805	type strain
9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>	JCM6124	type strain
10	<i>Leuconostoc lactis</i>	JCM6123	type strain
11	<i>Leuconostoc paramesenteorides</i>	NCDO803	type strain
12	<i>Leuconostoc gelidum</i>	NCDO2775	type strain
13	<i>Leuconostoc carnosum</i>	NCDO2776	type strain
14	<i>Leuconostoc amelibiosum</i>	NCDO2787	type strain
15	<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM20462	type strain
16	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	IAM1011	
17	<i>Lactobacillus casei</i>	JCM1136	type strain
18	<i>Lactobacillus brevis</i>	JCM1059	type strain
19	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149	type strain
20	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	IFO13951	type strain
21	<i>Lactobacillus lindneri</i>	DSM20690	type strain
22	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	JCM1164	type strain

【0020】実施例2

ペジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

(1) PCR法による16S / 23S rRNAスペーサー領域の増幅

のためのオリゴヌクレオチドプライマーの選定および合成

ペジオコッカス・ダムノサスの16S rRNA遺伝子の大部分は塩基配列が明らかにされており [DDBJ accession No. D87678]、1402番目~1421番目の塩基配列をもとにブラ

イマーを選定した。

【0021】 ペジオコッカス・ダムノサスの23S rRNA遺伝子は塩基配列が明らかにされているが、23S rRNA遺伝子の21～38番目の塩基配列は細菌間で保存性が高いことが報告されており (Microbiology: vol.142, 3-16 (1996))、その配列をもとに対応する相補的配列になるようにプライマーを選定した。

【0022】 (2) PCR法による16S / 23S rRNAスペーサー領域の増幅

実施例1で調製したペジオコッカス・ダムノサスのDNA溶液0.1μgを0.2mlチューブ (パーキンエルマー社) に取り、TaKaRa Ex Tag (宝酒造 (株)、登録商標) 中の10× Ex Tag (登録商標) バッファーを5μl、2.5mM dNTP混合物 (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) を4μl、5U/μlのIaKaRa Ex Tag (登録商標) を0.25μl、実施例2- (1) で調製した濃度100mMのプライマーを各々0.5μl、これに滅菌蒸留水を加えて50μlの溶液にした。このチューブを自動遺伝子増幅装置サーマルサイクラー (パーキンエルマー社) にセットし増幅反応を行った。反応条件は、94℃、2.5分間の変性後、94℃、30秒間の変性→55℃、30秒間のプライマーのアニール→72℃、30秒間の合成反応のサイクルを30サイクル行った。反応後5μlの反応液を取り、アガロースゲル電気泳動を行い、サイバークリーンでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その結果、約600bps (以下「ロング」と称す) と約450bps (以下「ショート」と称す) のDNAが増幅された。

【0023】 (3) スペーサー領域ロングのクローニング及びシーケンシング

PCR終了後の反応液を、High Pure PCR Product Purification Kit (ベールンガー・マンハイム社、商品名) を用い、未反応のdNTPを除去した。このように調製した増幅DNA 30ngにTA Cloning Kit (Invitrogen社、商品名) に含まれるpCR 2.1ベクターを2μl、T4 DNAリガーゼを1μl、10×ライゲーションバッファーを1μl、滅菌水を全量10μlになるように加え、14℃で一晩反応させた後、その2μlと0.5M β-メルカプトエタノール2μlをともに大腸菌INVαF'コンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% トリプトン、0.5% 酵母抽出物、10.0mM NaCl、2.5mM KCl、10.0mM MgCl₂・6H₂O、20.0mM グルコース) 250μlを加え、37℃、60分間振とうした後、50μg/mlアンピシリンおよび40μg/ml X-Galを含むLB平板培地に接種し、37℃、一晩培養した。現れた白色のコロニーを50μg/mlアンピシリンを含む3mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晩培養した。培養後、大腸菌よりプラスミド自動抽出装置を用いて、プラスミドを抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoR I (宝酒造 (株) 製) により37℃、60分間反応させた

後アガロースゲル電気泳動、サイバークリーンによるDNAの染色により、ロングが挿入されていることを確認した。

【0024】 このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンシングプライマーはIRD41 Infrared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよびIRD800 Infrared Dye Labeled M13 Reverse プライマー (日清紡製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long Read IR (登録商標) DNA シーケンシングシステム (LI-COR社製) を用いた。

【0025】 得られたペジオコッカス・ダムノサス (JC M5886) の16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域 (ロング) の遺伝子配列を配列番号1に示す。

【0026】 (4) スペーサー領域ショートのクローニング及びシーケンシング

実施例2- (2) のPCR終了後の反応液を、High Pure PCR Product Purification Kit (ベールンガー・マンハイム社、商品名) を用い、未反応のdNTPを除去した。このように調製した増幅DNA 30ngにTA Cloning Kit (Invitrogen社、商品名) に含まれるpCR 2.1ベクターを2μl、T4 DNAリガーゼを1μl、10×ライゲーションバッファーを1μl、滅菌水を全量10μlになるように加え、14℃で一晩反応させた後、その2μlと0.5M β-メルカプトエタノール2μlをともに大腸菌INVαF'コンピテントセルに加え、氷中、30分間放置した後、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% トリプトン、0.5% 酵母抽出物、10.0mM NaCl、2.5mM KCl、10.0mM MgCl₂・6H₂O、20.0mM グルコース) 250μlを加え、37℃、60分間振とうした後、50μg/mlアンピシリンおよび40μg/ml X-Galを含むLB平板培地に接種し、37℃、一晩培養した。現れた白色のコロニーを50μg/mlアンピシリンを含む3mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晩培養した。培養後、大腸菌よりプラスミド自動抽出装置を用いて、プラスミドを抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoR I (宝酒造 (株) により37℃、60分間反応させた後アガロース電気泳動、サイバークリーンによるDNAの染色により、ショートが挿入されていることを確認した。

【0027】 このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応を行った。シーケンシングプライマーはIRD41 Infrared Dye Labeled M13 Forward プライマーおよびIRD41 Infrared Dye Labeled M13 Reverse プライマー (日清紡製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle Sequencing Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社

製)を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA シークエンシングシステム (LI-COR社製)を用いた。

【0028】得られたベジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域(ショート)の遺伝子配列を配列番号2に示す。

【0029】実施例3

PCR法によるベジオコッカス・ダムノサスの検出

(1) ベジオコッカス・ダムノサス検出のためのプライマーの選定と合成

配列番号1、2を基にDNASIS (日立ソフトウエアエンジニアリング(株)、商品名)を用いてベジオコッカス・ダムノサスに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1のベジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23SrRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列上の378番目から400番目までの配列、および配列番号2のベジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列上の183番目から205番目までの配列を選定した。(配列番号3)

【0030】さらにベジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子配列の166番目~188番目より、配列番号4に示す特異的プライマーを選定した。これらのオリゴヌクレオチドを実施例2-(1)と同様の方法で化学合成した。

【0031】(2) 配列番号3および配列番号4の配列を持つプライマーを用いたベジオコッカス・ダムノサスの検出及び同定

実施例1で調製した各菌のDNA溶液を、実施例3で合成したプライマー(配列番号3および配列番号4)を用いてPCRを行った。PCRは以下の温度条件:

熱変性; 94°C 30秒

アニーリング; 48°C 1分

鎖長反応; 72°C 1分

を1サイクルとし、これを40サイクル繰り返して行った。PCR終了後、反応液をアガロースゲルにて、100V定電圧で30分間電気泳動に供した。反応液の他に、分子量マーカーとしてpHYマーカーも同時に泳動した。泳動終了後、サイバーグリーン溶液中で30分間染色した後、紫外線照射下でゲルを観察すると、配列番号3及び4を用いた場合、約1700bpsと約1500bpsのバンドがベジオコッカス・ダムノサスにのみ検出される。図1、2に電気泳動の結果を示す。

【0032】この結果より、本発明の配列番号3及び配列番号4のオリゴヌクレオチドをPCRプライマーとして用いた場合、ベジオコッカス・ダムノサスにのみ目的長のバンドが検出された。このことより、本発明の各オリゴヌクレオチドが、ベジオコッカス・ダムノサスの16S rRNAをコードする遺伝子と23S rRNAをコードする遺伝子の間のスペーサー領域の遺伝子配列および16S rRNAをコードする遺伝子上の標的とする塩基配列を正しく認識していることが示された。かつ、他のベジオコッカス属を始め、ビールを混濁させる可能性のある球菌やグラム陽性菌にも目的長のバンドは一切検出されなかったことから、本発明は、ベジオコッカス・ダムノサスを種特異的に検出出来ることを示し、ベジオコッカス・ダムノサスを検出出来ると同時に同定も行うことが出来るものであることが示された。

【0033】

【発明の効果】本発明は、ビール混濁に関係するベジオコッカス・ダムノサスに特異的な16SrRNA遺伝子と23S rRNA遺伝子の間に構成されているスペーサー領域の遺伝子配列を提供し、その配列を用いて迅速に感度よく検出できる方法を提供する。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Breweries, Ltd

<120> Genes for detecting bacteria and a detection method using them

<130> 99T3-45

<160> 4

<210> 1

<211> 479

<212> DNA

<213> Pediococcus damnosus

<400> 1

```

ggggtgaagt  cgtaacaagg  tagccgtagg  agaacctgcg  gctggatcac  50
ctcctttcta  aggatattta  gaaacggaaa  cctacacata  tgtcgagact  100
ttgttttagt  ttgagaggtc  tactctcaaa  tgtataagcg  cgaacgggcc  150
tatagctcag  ctggtttaga  gcgcacgcct  gataagcgtg  aggtcgatgg  200
ttcaagtcca  tttaggccca  taggtacatt  tttggggaat  tagctcagct  250
gggagagcgc  ctgccttgca  cgcaggaggt  cagcggttcg  atcccgcctat  300
tctccattga  cggcttagcc  gtcgaatttg  tttttgaaa  actaaataat  350
atcgaaaaat  tttctaattt  taattatcag  ataattaaac  cgagaacatt  400
gcgttttata  gagttttaaa  acaagattag  ttcaaaaata  atcgctaaac  450
tcgaaaacca  ctttatcttt  gataaagtt  479

```

<210> 2

<211> 284

<212> DNA

<213> Pediococcus damnosus

<400> 2

```

ggggtgaagt  cgtaacaagg  tagccgtagg  agaacctgcg  gctggatcac  50
ctcctttcta  aggatattta  gaaacggaaa  cctacacata  tgtcgaaact  100
ttgttttagt  ttgagaggtc  tactctcaaa  atttgttctt  tgaaaactaa  150
ataatatcga  aaaattttct  aattttaatt  atcagataat  taaaccgaga  200
acattgcgtt  ttatagagtt  ttaaaacaag  attagttcga  aaaataatcg  250
ctaaactcaa  aaccacctta  tctttgataa  agtt  284

```

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<400> 3

cagataatta aaccgagaac att 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<400> 4

tgctaatacc gcataataaa atg 23

【図面の簡単な説明】

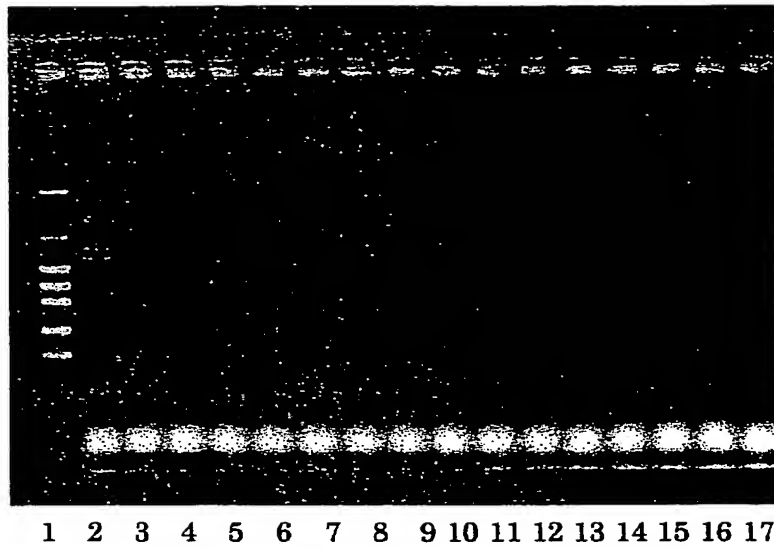
【図1】実施例1に示す各種菌株の電気泳動図である。

レーン1: pHYマーカー、レーン2: Pediococcus damnosus (JCM5886)、レーン3: Pediococcus acidilactici (JCM5885)、レーン4: Pediococcus dextrinicus (JCM5887)、レーン5: Pediococcus halophilus (JCM5888)、レーン6: Pediococcus parvulus (JCM5889)、レーン7: Pediococcus pentosaceus (JCM5890)、レーン8: Leuconostoc oenos (JCM6125)、レーン9: Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides (JCM6124)、レーン10: Leuconostoc lactis (JCM6123)、レーン11: Leuconostoc paramesenteroides (NCD0803)、レーン12: Leuconostoc gelidum (NCD02775)、レーン13: Leuconostoc carnosum (NCD02776)、レーン14: Leuconostoc ameli biosum (NCD02787)、レーン15: Megasphaera cerevisai 50

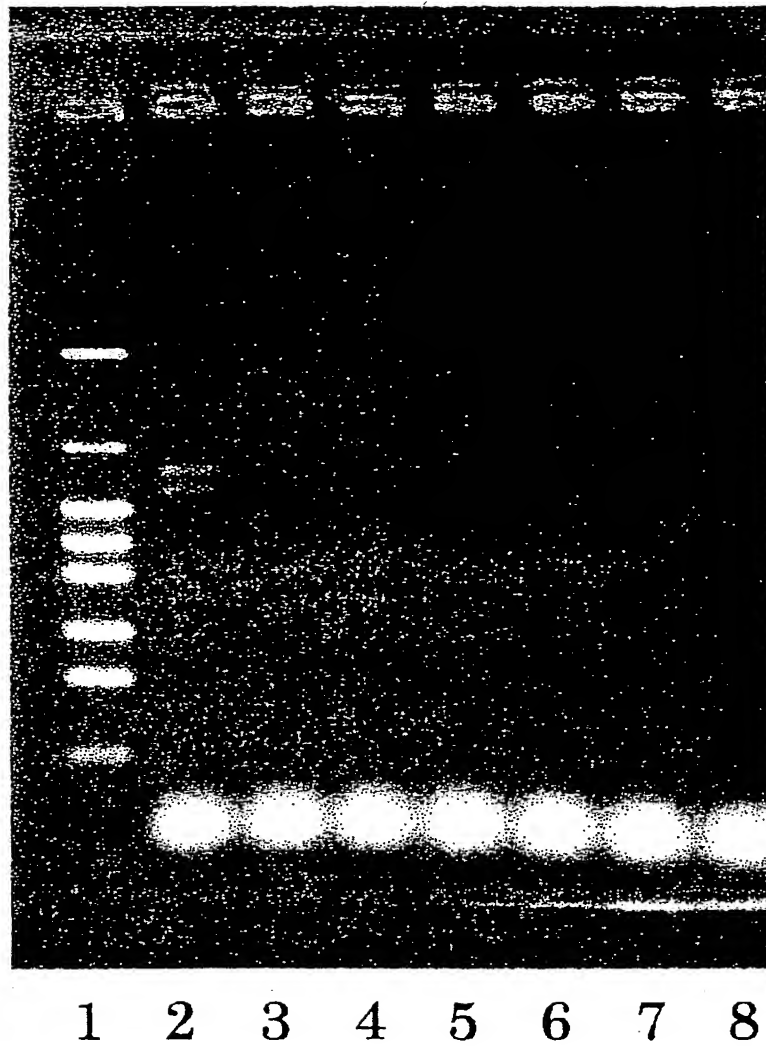
ae (DSM20462)、レーン16: Lactococcus lactis (JCM5805)、レーン17: Staphylococcus aureus subsp. aureus (IAM1011) pHY markerのバンドは上から順に4870bps、2016bps、1360bps、1107bps、926bps、658bps、489bps、267bpsを示す。

【図2】実施例1に示す各種菌株の電気泳動図である。レーン1: pHYマーカー、レーン2: Pediococcus damnosus (JCM5886)、レーン3: Lactobacillus casei (JCM1136)、レーン4: Lactobacillus brevis (JCM1059)、レーン5: Lactobacillus plantarum (JCM1149)、レーン6: Lactobacillus acidophilus (IF013951)、レーン7: Lactobacillus lindneri (DSM20690)、レーン8: Lactobacillus coryniformis (JCM1164) pHY markerのバンドは上から順に4870bps、2016bps、1360bps、1107bps、926bps、658bps、489bps、267bpsを示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 CA01
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ16 QQ42 40
QR08 QR32 QR39 QR42 QR62
QS25 QX02